

⑫ 公表特許公報(A)

平5-500516

⑬ 公表 平成5年(1993)2月4日

⑭ Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	審査請求	未請求	
A 61 K 35/14	ADT	9165-4C	予備審査請求	有	部門(区分) 3(2)
37/02	ADA	8314-4C			
// C 12 Q 1/56		6807-4B			

(全 15 頁)

⑮ 発明の名称 効能ある組織治療のための選択された量の血小板から放出された物

⑯ 特 願 平2-514044

⑰ 翻訳文提出日 平4(1992)3月16日

⑱ 出 願 平2(1990)9月14日

⑲ 国際出願 PCT/US90/05301

⑳ 国際公開番号 WO91/04035

㉑ 国際公開日 平3(1991)4月4日

優先権主張 ㉒ 1989年9月15日 ㉓ 米国(US) ㉔ 408,058

㉕ 発明者	ゴードニア, リチャード・エ	アメリカ合衆国ニューヨーク州11720, センターイーチ, エミリー・ドライブ 74
㉖ 発明者	ダフ, ロナルド・ジー	アメリカ合衆国ニューヨーク州11940, イースト・モリチエス, インレット・ヴュー・パス 67
㉗ 発明者	ニューマン, ダウン・ディー	アメリカ合衆国ニューヨーク州11940, イースト・モリチエス, インレット・ヴュー・パス 67
㉘ 出 願 人	キュラティブ・テクノロジー ズ・インコーポレーテッド	アメリカ合衆国ニューヨーク州11733, セトウケット, リサーチ・ウェイ 14
㉙ 代理人	弁理士 湯浅 恭三 外5名	
㉚ 指定国	AU, CA, FI, JP, KR, NO, SU	

請求の範囲

1、血小板から放出された物をサンプル中に存在する成分の量を示唆するアッセイを血小板から放出された物のサンプルについて実施し、そして

選択された量の血小板から放出された物を含む血小板放出物製品を製造し、該量は血小板から放出された物のサンプル中の成分の量と、血小板放出物製品に含まれるべき同一成分のあらかじめ定められた範囲の量とを比較することによって選択される、

ことからなる血小板放出物製品の製造方法。

2、選択された量の血小板から放出された物を含む血小板放出物製品を局所的に適用することからなり、該量は血小板から放出された物のサンプル中の成分の量と、血小板放出物製品に含まれるべき同一成分のあらかじめ定められた範囲の量とを比較することによって選択される、

ことからなる組織の治療方法。

3、血小板放出物製品及び血小板から放出された物のサンプル中に含まれる血小板から放出された物が、血小板の同じドローから得られる、請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

4、血小板放出物製品及び血小板から放出された物のサンプル中に含まれる血小板放出物が、同じ動物又はヒトに由来する血小板の異なるドローから得られる、請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

5、血小板放出物製品及び血小板から放出された物のサンプル中に含まれる血小板放出物が、動物又はヒトドナー群に由来する血小板ドローからの血小板プールから得られる、請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

6、血小板から放出された物のサンプル中に存在する成分が、ベータートロンボグロブリン(beta-thromboglobulin)、血小板由来増殖因子(platelet derived growth factor)、血小板由来血管形成誘導因子(platelet derived angiogenesis factor)、血小板因子4(platelet factor

4)、塩基性繊維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor)、酸性繊維芽細胞増殖因子(acidic fibroblast growth factor)、トランスフォーミング成長因子アルファ(transforming growth factor alpha)、トランスフォーミング成長因子ベータ(transforming growth factor beta)、血小板由来上皮増殖因子(platelet derived epidermal growth factor)及びフィブロネクチン(fibronectin)からなる群から選択される、請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

7、血小板から放出された物のサンプル中に含まれる成分がベータートロンボグロブリンである、請求の範囲第6項記載の方法。

8、血小板放出物製品が、血小板放出物製品1ミリリットル中に約25ナノグラムよりも高い濃度でベータートロンボグロブリンを含む、請求の範囲第7項記載の方法。

9、血小板から放出された物のサンプル中に含まれる成分が血小板由来増殖因子である、請求の範囲第6項記載の方法。

10、血小板放出物製品が、血小板放出物製品1ミリリットル中に約0.2ナノグラムよりも高い濃度で血小板由来増殖因子を含む、請求の範囲第9項記載の方法。

11、血小板から放出された物のサンプル中に含まれる成分が血小板因子4である、請求の範囲第6項記載の方法。

12、血小板放出物製品が、血小板放出物製品1ミリリットル中に約10ナノグラムよりも高い濃度で血小板因子4を含む、請求の範囲第11項記載の方法。

13、血小板から放出された物のサンプル中に含まれる成分が、血小板由来血管形成誘導因子である、請求の範囲第6項記載の方法。

14、選択された量の血小板から放出された物が、組織治療の実際の効能性をもたらすのに十分である、請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

15、効能性が少なくとも機能性評価スコアのグレード2と同等である、請求の

特表平5-500516 (2)

範囲第14項記載の方法。

16、組織が哺乳動物組織である、請求の範囲第2項記載の方法。

17、組織がヒト組織である、請求の範囲第16項記載の方法。

18、血小板が哺乳動物血小板である、請求の範囲第3項記載の方法。

19、血小板がヒト血小板である、請求の範囲第18項記載の方法。

20、動物が哺乳動物である、請求の範囲第4項記載の方法。

21、動物が哺乳動物である、請求の範囲第5項記載の方法。

22、血小板から放出された物のサンプルの活性量を示唆するアッセイを血小板放出された物のサンプルについて実施し；そして

選択された量の血小板放出物を含む血小板放出物製品を製造し、該量は血小板から放出された物のサンプルの活性量と、血小板放出物製品の同一活性のあらかじめ定められた範囲の量とを比較することによって選択される、

ことからなる血小板放出物製品の製造方法。

23、選択された量の血小板からの放出物を含む血小板放出物製品を局所的に適用することからなり、該量は血小板から放出された物のサンプルの活性量と、血小板放出物製品の同一活性のあらかじめ定められた範囲の量とを比較することによって選択される、

ことからなる組織の治療方法。

24、血小板放出物製品及び血小板から放出された物のサンプル中に含まれる血小板放出が、血小板の同じドローから得られる、請求の範囲第22項又は第23項記載の方法。

25、血小板放出物製品及び血小板から放出された物のサンプル中に含まれる血小板放出物が、同じ動物又はヒトに由来する血小板の異なるドローから得られる、請求の範囲第22項又は第23項記載の方法。

26、血小板放出物製品及び血小板から放出された物のサンプル中に含まれる血小板放出物が、動物又はヒトドナー群に由来する血小板ドローからの血小板プールから得られる、請求の範囲第22項又は第23項記載の方法。

27、血小板から放出された物のサンプルの活性が、繊維芽細胞分裂促進活性

(fibroblast mitogenic activity)、内皮細胞走化性活性(endothelial cell chemotaxis activity)、ウサギ角膜アッセイ活性(rabbit corneal assay activity)及び角化細胞走化性活性(keratinocyte cell chemotaxis activity)からなる群から選択される、請求の範囲第22項又は第23項記載の方法。

28、血小板から放出された物のサンプルの活性が繊維芽細胞分裂促進活性である、請求の範囲第27項記載の方法。

29、血小板放出物製品が、血小板放出物製品1ミリリットル中に約2.5 I/ED-50ユニットよりも高い繊維芽細胞分裂促進活性を有する、請求の範囲第28項記載の方法。

30、組織が哺乳動物組織である、請求の範囲第23項記載の方法。

31、組織がヒト組織である、請求の範囲第30項記載の方法。

32、血小板が哺乳動物血小板である、請求の範囲第24項記載の方法。

33、血小板がヒト血小板である、請求の範囲第32項記載の方法。

34、動物が哺乳動物である、請求の範囲第25項記載の方法。

35、動物が哺乳動物である、請求の範囲第26項記載の方法。

36、選択された量の血小板から放出された物が、組織治療の実質的効能性をもたすのに十分である、請求の範囲第22項又は第23項記載の方法。

37、効能性が少なくとも機能性評価スコアのグレード2と同等である、請求の範囲第36項記載の方法。

38、(i)血小板放出サンプル中の成分の量と、血小板放出物製品中に含まれるべき同一成分のあらかじめ定められた範囲の量とを比較することによって選択される、選択された量の血小板から放出された物；及び

(ii)該血小板放出物のための医薬的に受容し得る担体又は希釈剤からなる血小板放出物製品。

39、組成物が、血液又は血漿汚染物、及び血小板に含まれるが、血小板によって放出されない血小板ゴーストや他の物質を実質的に含まない、請求の範囲第3

8項記載の方法。

40、(i)血小板から放出された物のサンプルの活性量と、血小板放出物製品の同一活性のあらかじめ定められた範囲の量とを比較することによって選択される、選択された量の血小板放出物；及び

(ii)該血小板放出物のための医薬的に受容し得る担体又は希釈剤からなる血小板放出物製品。

41、組成物が、血液又は血漿汚染物、及び血小板に含まれるが、血小板によって放出されない血小板ゴーストや他の物質を実質的に含まない、請求の範囲第40項記載の方法。

田 糸月

効能ある組織治療のための選択された量の血小板から放出された物

[技術分野]

本発明は、効能ある組織治療のための血小板から放出される物の量選択に関する。

[背景技術]

組織修復又は「創傷治癒」は、静止した結合組織及び表面細胞を迅速に分裂し、迅速に動く細胞へと変える、多くの細胞的並びに生化学的反応を含む。この変化は、走化性(細胞の運動)、有糸分裂(細胞分裂)、及びタンパク質合成の増加を含む。表面細胞、繊維芽細胞、及び毛管内皮細胞が新組織の形成に関与する。表面細胞は組織修復の部位に移動して分裂し、新しい皮膚(上皮)を形成し；繊維芽細胞は移動して分裂し、修復部位(肉芽部位)を満たすマトリックスを生産し；毛管内皮細胞は移動して分裂し、繊維芽/コラーゲンマトリックスを脈管再生する新しい毛管を生産する。

細胞の移動及び分裂は、いくつかの生化学的作因に制御されている。これらの部分的に作用する作因が、各種細胞に作用してその移動及び分裂を指示する。

これらの各生化学的作因は、(1)走化的(即ち、化学誘引剤)で、ある種の細胞の移動(走化性)を引き起こす；(2)分裂促進的(即ち、マイトジェン)で、ある種の細胞の分裂(有糸分裂)を引き起こす；及び/又は(3)血管形成促進的(即ち、血管形成誘導因子)で、新しい毛管の形成(毛管上皮細胞の移動及び分裂)を引き起こす。生化学的作因の走化的、分裂促進的又は血管形成促進的性質は、一般に走化性、分裂促進性及び血管形成促進性を試験する各種の公知アッセイによって決定される。これらのアッセイのいくつかについては以下に記載する。同じ特徴を目的とするが、各性質の存在をより明確に定義又は測定することのできる、他のアッセイ法の開発が将来期待される。

血小板由来増殖因子(Platelet-Derived Growth Factor: PDGF)は、繊維芽細胞、平滑筋細胞及びグリア細胞に対する有

糸分裂及び化学誘引の活性を有する、よく性質を知られた30,000ダルトンの二量体糖タンパク質である。PDGFの存在下に、繊維芽細胞は修復を必要とする組織の領域に移動し、創傷部位自体において分裂するように刺激される。低濃度のPDGF(約0.5-1ng/ml)にさらされた細胞は移動するように刺激され、高濃度のPDGFを有する環境に移動したときに、分裂するように刺激される。

新血管形成又は毛管形成促進(新毛管形成)の過程は、毛管形成促進因子によって刺激される。血小板から回収される毛管形成促進因子(PDAF)は、毛管上皮細胞に対する分裂促進の活性を有しない純粋化学誘引剤であり、毛管形成促進因子源の方向へグラジエント的に移動するように毛管上皮細胞を刺激する。毛管細胞がいったん親毛管から移動し始めると、分裂を始める。多分この分裂は、かつて塩基性繊維芽細胞増殖因子(FGF)種の中に見いだされた、上皮細胞によって生産される自己分泌増殖因子によって制御される。

繊維芽細胞の移動及び有糸分裂と、上皮細胞の移動及び有糸分裂との組み合わせが肉芽組織を生産する。肉芽組織はまた、補体活性化からのC5A及び血小板からのトランスフォーミング成長因子ベータ(TGF-β)の存在によって修復部位に運ばれてくる好中球及び単球中にも豊富にある。これら食細胞の存在が汚染を減少し、感染を防ぐ。

TGF-βは、フィブリン-コラーゲンの合成に機能を有する25,000ダルトン(112アミノ酸)のポリペプチドである。TGF-βは繊維芽細胞の分裂を阻害し、そのマトリックス生産を増加する。TGF-βが分裂を刺激するのか、阻害するのかは、組織中に作用する全成長因子の機能による。PDGFの存在下では、TGF-βは通常分裂を刺激し、一方上皮増殖因子(後述)の存在下では通常分裂を阻害する。

肉芽組織の形成後、表面細胞は切断皮膚端(cut skin edge)から肉芽組織に移動し、新しい皮膚層を形成し、次いでこれが正常な皮膚に成熟する。この細胞活性は、表面細胞に対する化学誘引剤である血小板由来上皮増殖因子(PDEGF)によって少なくとも部分的に制御されている。

痕は何も報告されていない。

二重盲検法において、Knighton et al., Tissue Repair Symposium at Tarpon Springs, Florida, May 1987 (参照することによりここに包含される)は、コラーゲン基質中のPDWHFを用いる創傷治療をプラセボと比較した。24名の患者全員が標準的処方に従って創傷治療を受けた。PDWHFグループの13名の患者は、21例の創傷のうち、17例において治療8週間後に100%上皮化の治療を得た。一方、プラセボグループの11名の患者は、13例の創傷のうち、2例のみが100%上皮化に達した。プラセボ非治療創傷を次いでPDWHFで治療したところ、平均7.1週間で治癒した。PDWHF非治療患者にPDWHFを継続したところ、さらに治療平均5.8週間で100%上皮化を得た。

University of Minnesota Wound Care Clinicにおける患者群の前治療記録が切断、糖尿病性足治療(diabetic foot care)及び心臓外科分野における3人の全国的な権威者に提供された。73名の患者の136例の創傷を1から6の重症度[部分的厚み(thickness)から壊疽を伴う全厚みまで]に分類した。PDWHF治療を各ケースで開始した。75%以上が重症度3又はそれ以上の創傷を有していた。約70%の肢がかなり又は絶対的に切断の危険があると考えられていた。切断の危険無しと評価された26の肢は、いずれも切断を要しなかった。かなり切断の危険ありと考えられていた53の肢のうちの90%以上が救われた。即座に切断の必要ありと評価された肢(n=9)の救済率は86%であった。毎日創傷にPDWHFを適用することにより、肉芽組織形成と表面細胞成長刺激を促進した。慢性非治癒性創傷は、十分に機能的な皮膚に治癒された。

創傷治療に関する以前の研究において、PDWHF製剤は最終容積1ml当たり10⁶個の血小板を凝集して放出した。ドナーによる変動、又は特定のドナーのための時間による変動やこのような血小板から放出する物に含まれる創傷治療因子の能力を補正するために、血小板放出物の量を調節する試みは何らなされていなかった。放出物中に含まれる治癒因子の能力の変動を考慮しながら、組織の効能ある治療のための血小板放出物の量を選択することが本発明の目的である。

要約すると、組織修復又は“創傷治療”の過程は、少なくとも4つの成長因子:TGF-β、PDGF、PDAF及びPDEGFによって制御されている。修復されるべき組織におけるこれらの成長因子の存在は、繊維芽細胞の移動及び有糸分裂、上皮細胞の移動及びそれに続く有糸分裂、及び表面細胞の移動及び有糸分裂をもたらす。その結果、創傷部位が肉芽組織で満たされ、次いで再上皮化及び皮膚成熟化が起こる。

組織の自然治癒のためのこれらの因子の2つの主要な源は血小板とマクロファージである。体内で組織が損傷されると、凝析過程の活性化によって生産されるトロンビンの存在によって、血小板が放出される。これらの血小板は次いでPDGF、PDAF、PDEGF、TGF-β及び血小板因子4(PF-4は好中球及び単球に対する化学誘引剤である)を放出し、補体C5Aの放出を刺激する。PDGF、PDAF、PDEGF及びPF-4は、それ自体上記したように創傷を直接治療するのに寄与するが、一方TGF-β及びC5Aは損傷部位にマクロファージを誘引する。マクロファージもまた、いったん組織修復部位に集められると、同じか或いは同様のマイトジェン、化学誘引剤、及び毛管形成促進因子を放出する。しかしながら、今日までマクロファージはEGF-様活性を産出することが知られていない。

非治癒性創傷を改善することができない共通の理由は、感染、乏しい細胞充実性、少ない繊維芽細胞、新しい毛管の不存在及び乏しい炎症性細胞である。一方、治癒性創傷は、単核及びマクロファージ細胞浸潤物、分裂性繊維芽細胞及び多数の毛管を特徴とする。

Knighton et al., Ann.Sur. 1986, 204:322-330 (参照することによりここに包含される)は、慢性の非治癒性皮膚潰瘍を有する患者49名を、製品質コラーゲン軟膏中の自血血小板由来創傷治療処方(Platelet Derived Wound Healing Formula:PDWHF)を用いて治療した。慣例の治療と共に、創傷を平均19.8週で治癒した。100%上皮化への平均期間は10.6週間であり、100%治癒は、最初の創傷サイズとPDWHF治療の開始とに直接的関係を有していた。異常な組織形成、ケロイド又は肥大瘢

[発明の開示]

本発明によれば、選択された量の血小板放出物を含む血小板放出物製品を局所的に適用することにより組織が治療される。好ましくは血小板放出物製品は、所望の場合には、繊維芽細胞、毛管上皮細胞及び/又は表面細胞の移動及び/又は分裂を引き起こし、この細胞の分裂又は移動が治療領域における肉芽組織、毛管及び/又は上皮の形成に寄与するのに十分な量で、治療すべき組織に適用される。

本発明は、組織の治療に用い得る血小板放出物製品の製造法を提供する。血小板放出物サンプル中に存在する成分の量を示すアッセイを、血小板放出物サンプルに実施する。“成分”は、好ましくは創傷治療因子であり、その量は血小板放出物中に存在する所望の創傷治療因子の量と関係する。アッセイはこのような成分の量又は存在を検出するイムノアッセイであり、又はHPLCの使用のような成分の量又は存在を決定する他のいかなる方法でもありうる。アッセイの結果に基づいて、選択された量の血小板放出物を含む血小板放出物製品が製造される。血小板放出物サンプル中の成分の量と、放出物製品に含まれる同一成分のあらかじめ定められた量の範囲とを比較することにより量を選択する。本発明は更に、前記放出物製品を組織に局所的に適用することによる組織の治療法を提供する。

血小板放出物製品を製造する他の方法、及びかかる製品の組織への局所的適用は、血小板放出物サンプルの活性量を示すアッセイを血小板放出物サンプルに実施することを含む。

血小板放出物製品及び血小板放出物サンプルに含まれる血小板放出物は、同じ血小板のドロー(draw)から得ることが好ましい。若しくは、血小板放出物製品及び血小板放出物サンプルに含まれる血小板放出物は、同じ動物又はヒト由来の血小板の異なるドローから得ることもできる。更にまたは、血小板放出物製品及び血小板放出物サンプルに含まれる血小板放出物は、単一の動物又はヒト由来の、或いは複数の動物又はヒトドナー由来の、単一又は複数のドローから得た血小板のプールから得ることもできる。

血小板放出物製品に含むべき成分の量の範囲は、該血小板製品に含まれる

表1

組織治療の適用可能性

血小板放出物の選択された量が、選択された治療パーセントで組織治療の実質的効能を引き起こすのに十分のように、あらかじめ定められる。例えば、治療した創傷の50%以上において、少なくともグレード2の機能性評価スコア（後ほど定義する）を得るためのこのような治療効能が選択される。若しくは、血小板放出物製品の活性量の範囲は、同様に組織治療の所望する効能に基づく。

このような効能のために量があらかじめ定められる成分とは、ベータートロンボグロブリン（“B-TG”）、PDGF、PDAF、PE-4、塩溶性FGF、酸性FGF、TGF- α 、TGF- β 、PDEGF及びフィブロネクチンである。活性とは、繊維芽細胞有糸分裂活性（“FMA”）、上皮細胞走化性活性（“ECCA”）、ウサギ角膜アッセイ活性（“RCAA”）又は角化細胞走化性活性（“KCCA”）でありうる。

最後に、血小板放出物は、かかる血小板放出物のための医薬的に許容し得る担体又は希釈剤と組み合わせて血小板放出製品を製造することができる。更に、製品は実質的に血液又は血漿汚染物を含んでおらず、また血小板中には含まれていないが、血小板によって放出されない血小板ゴーストや他の物質を含んでいない。

“治療”は、創傷治療、美容、又は治療すべき組織の領域における血管形成性、有糸分裂性、又は走化性活性を促進することが望ましい他の全ての過程を含む。組織への治療の適用は、表1に記載するものを含むが、これに限定されない。このような治療は、組成物を領域表面又は組織体に適用するという意味において局所的であるが、系統的に適用されない。

D、慢性拘縮の予防による皮膚移植における美容的効果の改善

IV、無傷の皮膚の再血管化

A、糖尿病性類脂肪性壊死

B、照射誘導性皮膚虚血

C、フェンフィガスブルガリス（*phemphigus vulgaris*）

V、美容的適用

A、毛髪成長

B、皮膚新生準備

C、皺治療

VI、急性外科創傷の治療

A、緩和的放出性の生物分解性投与系と組み合わせると、遅滞期を短くすることによって組成物は通常の創傷修復率を増強することができる。この遅滞システムは組成物を局所的に任意の外科的創傷、または皮膚の裂目、または体内器官に適用できる。

VII、内部外科的適用

A、組成物は内部外科的又は外傷的創傷の修復を速めることができ、これは肝臓裂傷、腎臓裂傷、脾臓裂傷、及び腸、結腸又は胆嚢樹枝状構造（*biliary tree*）のような吻合術を含むが、これに限定されない。

B、肝臓及び脾臓の外傷的創傷のような内部創傷への局所的投与

C、組成物は腹腔内臓傷に適用して修復を速めることができる。例えば、腹腔内臓傷を経皮的にドレンして、ドレンをその場に保持するときには、その可能性のある部位の修復を速めるために、腹腔表面に組成物が局所的に適用されるように、ドレンを通して組成物を注入することができる。

VIII、獣医的適用

A、外科修復促進

B、ウマなどの慢性、非治癒性創傷の修復促進

C、ウマ長骨骨折の修復促進

D、家畜に収縮過程が起きて、乳管が閉鎖するのを抑えるために、家畜の創傷治

I、慢性の非治癒性皮膚創傷の治療

A、虚血性創傷

1、糖尿病性創傷

2、アテローム性動脈硬化症による虚血性創傷

3、細動脈炎による創傷

B、静脈虚血創傷

1、静脈炎後症候群

2、外傷後静脈虚血

C、褥瘡

1、仙骨褥瘡

2、座骨褥瘡

3、踵および踵の褥瘡

4、他の圧力部分の褥瘡

D、持続性皮膚外傷による創傷

II、急性創傷の局所的治療

A、分離性厚み（*split thickness*）創傷

1、皮膚移植ドナー部位

2、自動車事故などに由来する剥離

B、全厚み皮膚喪失

1、剥離性（*degloving*）損傷

2、外傷性皮膚喪失

3、外傷性皮膚壊死

III、火傷

A、分離性厚み皮膚移植ドナー部位修復

B、肉芽組織形成の促進及び初期性減組織除去及び皮膚移植

C、第2度の火傷の再上皮化促進

療のための組成物投与系を考案することができる。

IX、眼科的適用

A、角膜潰瘍の治療促進

B、角膜移植の治療促進

C、その他の眼科的手術の治療促進

X、整形外科的適用

A、通常の骨折治療促進

B、癒着欠如の修復刺激

C、骨移植治療の容易化

D、糖尿病性骨髄炎後の修復刺激

E、組織の成長を促進するために、組成物を補綴物質（関節置換体など）と組み合わせることができる

F、腱及び靱帯の修復促進

G、人工腱の取り込み刺激

XI、ENT適用

A、乳様突起切開術創傷の修復促進

（慢性の非治癒性創傷に対するのと同様の局所的投与を伴うことができる）

B、人工補綴（鼓膜、鼓膜管、又は人工オイスティ管など）との組み合わせ

II、整形的適用

A、組織改造創面（組織の損傷を新しい組織で充填する）

B、補綴（例えば、胸部充填）への内部成長を刺激

C、皮膚弁における修復促進を刺激

D、組成物の局所的投与によって得られる瘢痕は、刺激を受けない瘢痕よりもはるかに美容的に満足できるものであり、これを瘢痕改善に局所的に使用できる

E、手などの腕の損傷の修復促進

XIII、歯科

A、乾燥ソケットの修復促進

B、通常のソケット修復促進

特表平5-500516 (5)

表1A

本発明の組成物の更に可能な適用

C、歯科移植物の内部成長促進

D、歯骨ラインにおける歯肉成長の促進

XIV、胃腸管の適用

A、スクラルフェート (Sucralfate) のような医薬を組み合わせると、組成物は胃及び十二指腸潰瘍の修復を促進

B、浣腸として投与すると、組成物は結腸における潰瘍性大腸炎の修復を促進

C、緩和信息化物質中で経口投与すると、組成物は肉芽性大腸炎の修復を促進

XV、心臓外科

A、人工移植物と組み合わせると、組成物 (特に血管形成誘導因子) は新しい血管形成を刺激して、毛管の内部成長から移植物を再上皮化する

XVI、人工内分泌器官

A、血管形成誘導因子は再毛管の内部成長を刺激して、体内に移植できる人工内分泌器官のチューブを形成するのに使用できる。チューブを通して毛管が成長を刺激され、全く異種移植の内分泌系の使用を可能にするために、細胞又は小島 (islets) がチューブの外側に成長する。

XVII、狭窄形成

A、現在食道、胆嚢樹状枝構造、尿道及び尿管に使用されているステントと組み合わせ、血管形成促進及び再狭窄形成率を減少するステント化チューブ構造の治癒の刺激に用いることができる。組成物がステント周囲の組織表面に局所的に適用されるように、緩和信息化形態で組成物をステントに投与する。

本発明の組成物の使用は表1Aの1に記載したもの全てを含むが、これに限定されるものではない。

I、心筋梗塞の尿管再生

A、組成物は、緩和信息化系を用い、核磁気共鳴イメージングで導きながら心臓カテーテル化又は経皮的に、心筋梗塞の中心部に注入し、梗塞修復を促進する

B、抗-変性コラーゲン抗体で覆ったリボソームで組成物を標的化し、創傷又は心筋梗塞部位に移動するように静脈内投与する

II、神経損傷の尿管再生

A、組成物は緩和信息化系で脳梗塞又は脊髄に注入されて修復を促進

B、上記Iと同様に、組成物を集めた標的リボソームを抗-変性神経抗体を用いて、神経損傷部位に移動するように静脈内投与する

化学物質がここで記載する血管形成性、有糸分裂性、及び走化性の対応するアッセイ、又は当業界で適用され、或いは将来開発される同様なアッセイにおいて正の応答を示すとき、本明細書並びに請求の範囲において該化学物質は“走化活性”、“有糸分裂活性”又は“血管形成促進活性”を有するという。

[図面の簡単な説明]

図1は、フロリダでの研究における、血小板放出抽出物中のB-TG (ng/ml) と機能性評価との関係を表す図である。

図2は、カンサスシティでの研究における、血小板放出抽出物中のB-TG (ng/ml) と機能性評価との関係を表す図である。

図3は、ミネソタでの研究における、血小板放出抽出物中のB-TG (ng/ml) と機能性評価との関係を表す図である。

図4は、血小板放出抽出物中のPF-4とB-TGとの関係を表す図である。

図5は、血小板放出抽出物中のPDGFとB-TGとの関係を表す図である。

図6は、血小板放出抽出物中のFMA活性とB-TGとの関係を表す図である。

[発明の詳細な説明]

組織治療の効能は慢性的非治癒性皮膚創傷について定義されてきた。機能性評価グレード1-4は、以下の評価に基づいて創傷治癒成熟度を測定する:

(1) 100%以下の上皮化: ドレン有り; ドレッシング (包帯などによる外傷保護) を要する。

(2) 100%上皮化: ドレン有り; ドレンのコントロールのためのドレッシングを要する。

(3) 100%上皮化: 少量のドレンを伴う成熟性皮膚; 保護的ドレッシングのみを要する。

(4) 100%上皮化: 100%成熟機能性皮膚; ドレッシングを要しない。

慢性的非治癒性皮膚創傷の治療のための好ましい手順は、1日1回、毎日同じ時間に、血小板放出物製品を適用することを含む。製品は、それを洗い落とす前に少なくとも8時間創傷上に留まるべきである。製品が創傷上にない残りの12時間については、食塩水で湿潤するか、或いは乾いたドレッシングを創傷部位に適用するべきである。

創傷治療を目的とする血小板放出物製品は患者自身の血液から直接調製することが好ましいが、その他の出所の血液又は古い (outdated) 血小板を用いても本発明の利点は得られる。患者自身の血液を用いると、貯蔵血液から肝炎、AIDS、又はその他の汚染を受ける可能性を避けることができるので、これを開示する。患者自身の血液を用いると外来血液に対するほとんどのアレルギーを排除することもできる。しかし、製品の代替原料としては、血統の判明している血液 (即ち、肝炎、AIDSなどの検査をした人からの血液)、又は古いヒト血小板であり、単一の、又は複数の出所から得ることができる。他の種からの血液もヒトに適用することができる。最後に、その動物自身、同じ種に属する他の動物、又は他の種の動物に由来する血小板を用いて、血小板製品を獣医的用途に用いることができる。

[実施例]

実施例1

クエン酸デキストロース (acid citrate dextrose) 抗凝血物質 (以後ACDという) 6ml中の原料、又は全血10ml当たり1mlのACDで全血60mlを得た。シリンジを逆さにして回転させて血液をAC

Dとよく混合した。抗凝血血液サンプルを次の操作に用いるまで水上に保存した。

抗凝血血液を2本の滅菌、シリコン加工した50mlの円錐底遠心管に移し、管にサンプルを平均に分散させた。次いで管を約4℃で20分間、135xgで遠心した。遠心サイクル終了時にローターを停止するまで回転させておいた。ブレーキはかけなかった。血小板に富む血漿 (platelet-rich plasma; 以後PRPという) である、遠心サンプルの上澄み層を滅菌ビベットで他の滅菌、シリコン加工した遠心管に注意深く移した。1回に4-5mlずつのみを吸い上げるにより、赤血球細胞汚染によるPRPのロスを最小にすることができた。次いで、当業界で公知の方法を用いて、PRPの血小板数をカウントした。

PRPを約4℃で10分間、750xgで遠心した。血小板のペレットを移動させないように注意しながら、上澄みを捨てた。滅菌ビベットを用いて、0.05M HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸)、0.03M デキストロース、0.004M KCl、0.1M NaCl、を含み、28℃でpHを約6.5に調整した緩衝液 (以後血小板緩衝液という) を吸い上げて押し出すことにより、懸濁液1ml当たり約10⁸個の血小板の濃度になるようにペレットを再懸濁した。

得られた血小板懸濁液を次いで精製トロンビンで活性化した。好ましくは、血小板懸濁液1ml当たり約1ユニットのトロンビンを血小板懸濁液に加えて混合した。血小板とトロンビンを室温で約10分間インキュベーションした。インキュベーション後、懸濁液を滅菌ビベットで吸い上げて押し出すことにより、得られた血小板凝集体を破壊した。

若しくは、血小板にその中身を放出させるような他の活性化剤で活性化することもできる。他の活性化剤とは、10%血小板、好ましくは緩衝液中に2-10μmolのADP、好ましくは緩衝液中に25-450μmolのエピネフリン、及び好ましくは緩衝液中に35-50μmolのアラキドン酸を含む緩衝液1ml当たり、好ましくは6-100μgのモノマーコラーゲンである、コラーゲンを含む。

特表平5-500516 (6)

実施例3

血小板放出物製品は好ましくは液体製剤で患者に投与される。血小板放出抽出物、即ち、血小板凝集液中の凍結血小板放出物は、室温に溶かすことができる。室温で測定した容量の抽出物を遠心管に加えて、血小板凝集液を遠心管に加えて好ましい希釈度となるようにする。血小板凝集液を加える前に、リドカイン0.5mlを加えてもよい。この場合、凝集液は担体として作用する。また、ある場合には抽出物は更に希釈することなく使用することもできる。

実施例4

その他の態様として、血小板放出物製品は、生物的に矛盾がなく、かつ上澄み中の活性成分の一時的な“蓄積質 (depot)”として作用する担体物質中の抽出物からなる、ペースト製剤として適用することもできる。微晶質コラーゲン (例えば、Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TXから市販されているAvitene®ブランドの微晶質コラーゲン) のような大分子の物質が適当な担体である。

ペースト状血小板放出物製品を製造するには、抽出物を溶かして液体製剤と同様に希釈した。適量の抽出物をAvitene微晶質コラーゲンのビンに滅菌ビベットで入れ、均一な濃度とする。若しくは、抽出物を微晶質コラーゲンと混合してもよい。

得られるペースト状血小板放出物製品を含むビンは、蓋をして患者に適用するまでの間、氷と共にプラスチック袋に入れるか、或いは凍結して輸送又は貯蔵する。

実施例5

102例の非治癒性皮膚創傷を含む、フロリダ、U. S. A.での創傷治療研究において、自己認識性 (autologous) 血小板放出物製品を用いて上記の手順に従って創傷を治療した。血小板放出物製品は、以下のようにして製造した：実施例1の方法によって製造した血小板放出抽出物を更に1:100に希釈して血小板放出物製品を製造した。血小板放出物製品を局所的に適用する前に、ASSERACHROM B-TGとしてDiagnostica Stang

更に他の態様として、PRPは遠心前にトロンビンで活性化することもできる。活性化PRPは以下に記載するように、液体又はペースト調製物に取り込めることもできる。

好ましい態様においては、得られた上澄みを約4℃で約5分間、950xgで遠心して、懸濁液中に含まれる放出された血小板ゴーストやフィブリンを除去した。この遠心で形成されたペレットを、上澄み抽出後に捨てた。

血小板ゴースト及びフィブリンを除去した後、残る上澄みは血小板凝集液中の血小板放出物からなり、これを血小板放出抽出物と呼ぶ。該抽出物を貯蔵用に4mlで凍結するか、或いはアッセイ用に直ちに使用するか、或いは以下に記載するように液体又はペースト製品を製造する。

実施例2

血液銀行又はその他の出所から得た血小板から血小板放出抽出物を調製することができる。フェレシス (pheresis) 血小板濃縮物が血液銀行から得られ、即座に処理される。血小板1ユニットはPRP約200mlとなるであろう。

PRPを約4℃で10分間、750xgで4回遠心し、各遠心後に血小板ペレットを血小板凝集液中に再懸濁する点を除いて、抗凝集化された患者血液サンプルを上記のように処理したのと同様の方法で、濃縮物を処理して活性化血小板懸濁液を得ることができる。4回目の遠心後、血小板ペレットを血小板凝集液中に再懸濁して、約10⁹血小板/mlの濃度にする。

血小板懸濁液を上記のように活性化して、約4℃で10分間、950xgで遠心する。上澄みを抽出し、約4℃で15分間、10,000xgで遠心して残留血小板及び全てのフィブリンを除去する。上澄みを抽出した後、ペレットを捨て、血小板放出抽出物である上澄みを貯蔵用に4mlで凍結するか、或いは以下に記載する液体又はペースト調製物を製造するために直ちに使用する。

血液銀行血小板から製造する更に他の方法として、銀行血小板から製造したPRPを遠心前に直接活性化することができる。

O, Asnieres-Sur-Seine, Franceから市販されている、ベータトロンボグロブリンのためのイムノアッセイを、血小板放出抽出物に対応する製品について実施して、抽出物自体に含まれているB-TGの量を測定した。治療終了後に、機能性評価のために創傷をグレード分けした。血小板放出物サンプル (この場合は抽出物) 中に含まれるB-TGの量は、以下の機能性評価によって測定した、血小板放出物製品による治療の成功と関連していた：

変数： B-TG対FA
サンプル数： 102
スピアマン R： 0.2427
T-値： 2.5023
2-テイル P： .014

図1は、データの代表的プロットを示す。

実施例6

自己認識性血小板放出物製品で治療した86例を含む、カンサスシティ、U. S. A.での創傷治療研究で、前記の実施例を繰り返した。血小板放出物サンプル中に含まれるB-TGの量は、以下の機能性評価と関連していた：

変数： B-TG対FA
サンプル数： 86
スピアマン R： 0.3508
T-値： 3.4328
2-テイル P： 0.0009

図2は、得られたデータの代表的プロットを示す。

実施例7

自己認識性血小板放出物製品で治療した32例を含む、ミネソタ、U. S. A.での創傷治療研究で、実施例5を繰り返した。血小板放出物サンプル中に含まれるB-TGの量は、以下の機能性評価と関連していた：

変数： B-TG対FA
サンプル数： 32
スピアマン R： 0.3629
T-値： 2.1329
2-テイル P： 0.0412

図3は、得られたデータの代表的プロットを示す。

創傷治療の前記実施例に基づいて、創傷治療の成功は製品を製造するために用いられた抽出物中に含まれるB-TGの量と関連していた。従って、血小板放出物製品は、好ましくは製品中にあらかじめ定められた範囲の量のB-TGを含むように製造されるべきである。製品は血小板放出抽出物の希釈物を含むので、抽出物製剤中、又は製品を構成するのに用いる血小板放出物の量を調節して、放出抽出物に含まれるB-TG量を明確にするべきである。放出物中のB-TG量はドナーによって、また特定ドナーについては時間によっても変化するが、この製造工程は製品中に所望量のB-TGを含むようにすることができる。

図1から3に示すように、もしも2又はそれ以上の平均FAグレードを所望する場合には、B-TG量は、製品1ml当たり少なくとも約25ngである。もちろん、製品1ml当たり66ng以上のB-TG量が、本研究で試験したB-TG量の範囲内で最適な治療を与える。

若しくは、最小又は最適量の血小板放出物を含む血小板放出物製品を製造するために、血小板放出物の他の成分を用いることもできる。これらの成分は、PDGF、PDAF、PF-4、増基性FGF、酸性FGF、TGF-2、TGF-β、PDGF及びフィブロンectinを含むが、これに限定されない。実施例8から9は、B-TGとPF-4とPDGFとの関係を示す。

実施例8

41例の自己認識性血小板放出物サンプルを用いて、上記B-TGイムノアッセイによってB-TGをアッセイし、またDiagnostica StagoからASSERACHROM PF-4として市販されているPF-4イムノアッセイによってPF-4をアッセイした。血小板放出物サンプル中のB-TG量は、

以下に示すようにPF-4と関連していた：

変数： B-TG対PF-4
 サンプル数： 41
 スペアマン R： 0.9148
 T-値： 14.1449
 2-テイル P： <0.0001

図4は、データの代表的プロットを示す。

実施例9

41個の自己認識性血小板放出サンプルを上記のB-TGアッセイに従ってアッセイし、また以下のアッセイ手順に従ってPDGFをアッセイした：

PDGF EIA手順

第1日：

- 1、ブロック反応プレート(R) (Dynatech Imm-1, 丸底)
 - a) 1ウェル当たりPT-20 (PBS TWEEN-20 .05%) 150 μ l 添加
 - b) R-プレートをカバーして37℃で60分間、インキュベーション
 - c) R-プレートを吸引及び乾燥、工程3に進む
- 2、コート定量化 (Coat Quantitation) プレート(Q) (Dynatech Imm-2, 平底)
 - a) 150 μ l /ウェルのPDGFcsis (コーティング緩衝液中40 ng /ml) 添加
 - b) ジップロックの袋中、カバーして4℃で一夜、Q-プレートをインキュベーション
- 3、ブロック後
 - a) ポリプロピレンチューブを用いて、PBA-T/20 (PBS+1%BSA + .05%T-20) 中でサンプル希釈を実施。よく混合する
- 4、R-プレートにサンプル添加

図5は、データの代表的プロットを示す。

更に他の懸梯として、最小又は最少量の血小板放出物を含む血小板放出物製品を製造するための基礎として、血小板放出物の活性を用いることができる。これらの活性は、繊維芽細胞分裂促進活性 ("FMA")、上皮細胞走化活性 ("ECCA")、ウサギ角膜アッセイ活性 ("RCAA") 及びケラチノサイト細胞走化活性 ("KCCA") を含むが、これに限定されない。実施例9は、B-TGとFMAとの関連を示し、実施例10-12は、追加の活性を定義するアッセイを開示する。

実施例9

41個の自己認識性血小板放出物サンプルを、上記のB-TGイムノアッセイによってB-TGをアッセイし、また以下のFMA手順によってFMAをアッセイした。

設定

- 1、試験すべきFMAサンプルに必要なマイクロタイタープレートの数を決定する (1枚のプレートは、必要なコントロールを"含めて" 24個の4重サンプル、又は32個の3重サンプルを収容する)。
- 2、10%熱-不活性化ウシ血清 (10%HI-CS) を含むダルベッコの改良イーグル培地 (DMEM) を、1プレート当たり約20 ml用意する。更に40 ml DMEM/10% HI-CSを用意する (細胞調製に使用)。
- 3、液体窒素中で凍結貯蔵しておいた、適当な数の3T3 (A31) 繊維芽細胞のチューブを37℃水浴中で溶かす (チューブ当たりの収率は凍結パッチによって異なる。1マイクロタイタープレート当たり約2,000,000個の生存できる細胞を要する)。
- 4、20 ml (5-10 ml) のDMEM/10% HI-CSを含む滅菌した50 ml培養チューブ (液体量を少なくして12 ml又は15 mlチューブもこの目的に用い得る) に細胞を無菌的に移動する。よく懸濁して、室温中、10分間、450 x gで遠心 (シールドされたスイングバケットローターを備えたMistral 3000 i中で1400 rpm) する。上澄みを捨て、細胞を

- a) 60 μ l /ウェルのヤギ抗-PDGF (PBA-T-20中に希釈) を2 μ g/mlで添加
- b) 60 μ l /ウェルの希釈サンプル又は標準を添加
- c) 袋中、カバーして4℃で一夜、R-プレートをインキュベーション

第2日：

- 1、Q-プレート吸引
 - a) Q-プレートを吸引
 - b) 150 μ l /ウェルのPT-20でQ-プレートをブロック (1-2時間、37℃)
 - c) 吸引、3回洗浄、風乾
- 2、R-プレート移動
 - a) R-プレートの内容物をQ-プレートに移動 (100 μ l)
 - b) Q-プレートを室温で30分間インキュベーション
 - c) 吸引及び洗浄
- 3、色反応
 - a) 100 μ l /ウェルのラット抗-ヤギペーパーオキシダーゼ (1 μ g/ml) 添加
 - b) 室温で1時間インキュベーション
 - c) 吸引及び洗浄
 - d) 100 μ l /ウェルの基質 (テトラメチルベンジジン) を添加
 - e) プレートを読む

血小板放出物サンプル中に含まれるB-TGの量は、以下のようにPDGFの量と関連していた：

変数： B-TG対PDGF
 サンプル数： 41
 スペアマン R： 0.8103
 T-値： 8.6359
 2-テイル P： <0.001

- レットを滅菌した12 ml培養チューブに移して、10 ml DMEM/10% HI-CS中に再懸濁する。遠心を繰り返す。
- 5、細胞ペレットを約2-5 ml DMEM/10% HI-CS中に再懸濁する。細胞カウントを行う。
- 6、DMEM/10% HI-CS中に細胞を希釈して、1 ml当たり約200,000細胞の濃度を得る (各プレートにつき10-11 mlが必要)。
- 7、8又は12のマルチチャンネルピペッターと滅菌ボートリザーバーを用いて、96ウェルのマイクロタイタープレートに1ウェル当たり100 μ lを添加する。細胞-懸濁液を適切に維持するために、1列当たり少なくとも1回ピペッターの懸濁液を吸引、押し出して確実に均一にする。
- 8、各ウェルに100 μ l DMEM/10% HI-CSを添加する (合計1ウェル当たり200 μ lの液体量となる)。
- 9、細胞系及びプレート調製の日付をプレートにラベルする。プレートを37℃、5% CO₂で3日間、又は繊維芽細胞が集密的になるまでインキュベーションする。

培地交換/第3日

- マイクロタイタープレートを開始してから3日後に、培地を0.8% HI-CS/DMEMに交換して継続する必要がある。
- 1、顕微鏡下でプレートを検査して、繊維芽細胞が集密的に成長したかどうかを決定する (細胞間にギャップがあってはならない)。もしも細胞が集密的であったならば、継続する。もしも細胞が集密的でなかったならば、更に1日成長させるか、或いは廃棄する。
- 2、16 ml /プレート 0.8% HI-CS/DMEMを調製する。
- 3、フード下に、滅菌バリア (barrier) シートを広げて置く。1度に1個ずつプレートをシンクに取り出し、注意深く、やさしく動かしてプレートの液体を全て1度に出す。直ちに再カバーをする。
- 4、滅菌フードに素早く戻し、滅菌バリア上で開いたプレートをやさしく吸い取って過剰の液体を除去する。

特表平5-500516 (8)

5、8又は12のチャンネルピペッターを用いて、1ウェル当たり150 μ lの0.8% HI-CS/DMEMを素早く、かつやさしく添加する。出来る限り葉状細胞を乱さないように注意しなければならない。工程3から5を次のプレートに繰り返す。

6、プレートを37℃、5% CO₂で6時間インキュベーションする。

7、過剰の0.8% HI-CSを希釈用にとって置く。

細胞刺激/培地交換後6時間

10%から0.8%のHI-CSに培地交換をした6時間後に、細胞は刺激される状態になっている。

1、試験すべき各コントロール及びサンプルのための各マイクロタイタープレートの概略及び配置を決める。

2、上部左の隅から始めて、最初の3又は4ウェルには50 μ lの0.8% HI-CS/DMEMのみを入れる（これはプレートのバックグラウンドコントロールとして働く）。

3、次の3又は4ウェルには（水平方向に進む）、1ウェル当たり20 μ lの非希釈HI-CS及び30 μ lの0.8% HI-CSを入れる（従って最終希釈度=10% HI-CS）。

4、次の3又は4ウェルには、50 μ lの血小板緩衝液コントロール（10mM血小板緩衝液+50 μ lトロンビン）を入れる。

5、50 μ lの試験/コントロールサンプルを添加する。

6、プレートを37℃、5% CO₂で18時間インキュベーションする（時間の一貫性が重要である）。

放射性標識

試験及びコントロールサンプルで刺激した18時間後に、FMAマイクロタイタープレートを放射性チミジンで標識し、分裂促進活性を試験する。

1、放射性核種使用中の事故もれを吸収するために、作業場表面一帯を使い捨てのペーパーライナーで覆う。保護手袋を使用すること。

2、以下のように10 μ Ciの[3H]-チミジン/ml DMEM溶液を調製

する：0.5ccの[3H]-チミジン（NEN cat no. NET-027. 6.7Cimmoil. 1mCi/ml）を49.5ml DMEMに緩衝的に移す（1/100希釈）。

3、各ウェルに50 μ lの[3H]-チミジン/DMEM溶液を添加。次のために残りの放射性溶液を冷蔵庫に保存する。

4、ピペット先端、手袋、少量の標識培地を有する分配容器、及びペーパーライナーを放射線用ごみ箱に正しく廃棄する。

5、プレートを放射性とラベルして、もれを吸収するためのトレー中で37℃、5% CO₂で6時間インキュベーションする。

回収

1、NUNCイムノウッシュを用いて、放射性培地を注意深く吸引する。吸引先端が細胞と接触することを防ぐために、添付の“持ち上げピン（raise pin）”を必ず使用する。

2、多チャンネルピペッターで200 μ l PBSを加えて細胞を洗浄する。NUNCイムノウッシュで吸引する。

3、各ウェルに200 μ lの0.25%トリプシン/HBSS（Ca、Mgを含まない）を添加する。37℃、5% CO₂で30分間インキュベーションする。

4、Skatron Combi Celi Harvesterを用いてプレートをガラスフィルターペーパー上に回収する。

5、Skatron Filter Transfer器具を用いて、湿ったフィルターペーパーディスクをシンチレーションバイアル（Packard Picopro Vials）に直ちに移す。

6、フィルターディスクを一夜、或いは乾燥オーブン中で1-2時間乾燥させる。

シンチレーション準備

1、各バイアルに4mlのシンチレーションカクテル（Beckman Ready-Safe）を添加する。

2、バイアルに堅く蓋をして数回強く振って、フィルターをカクテルに完全にさらし、また気泡があるときはこれを抜く。

カウント

1、バイアルをBeckman LS1701の緑のラックに左から右の順に置く。

2、18番目の位置にONEバイアルを有する空の緑のラックからなる“プログラムラック”をまずカウンタに置き、器械にプログラムN0.1を使用するよう指示する。

3、プログラムN0.1は以下のようにプログラムされる：

—繰り返し： 3

—カウント時間： 2分

—H#： No

—サンプルリポート： 1

—データ計算： CPM

—SCR： Yes

—RCM： Yes

—バイアルサイズ： ミニ

—カウントプランク： No

4、まず右側で“終わりから始めへ（back to front）”、次いで左側で“始めから終わりへ”動かしながら、残りのラックをカウンタに置く。常に赤のストップラックで終わる。

5、同時に“RESET”ボタンを押す。

6、RESETが終了し、プリンターに十分紙があることをチェックしたら、STARTボタンを押してカバーを再びかける。

7、最初のプリントアウトを見て、プログラムが正しく使われているかを確認する。

1/ED-50のユニットは、繊維芽3T3細胞において分裂促進活性の50%刺激をもたらす血小板放出サンプルの希釈度を表す。例えば、もしもサンプルの0.25又は1：4希釈が50%刺激を与えるならば、1/ED-50は4ユニットである。同様に、1：8の希釈度は1/ED-50 8ユニットを与える。

血小板放出物サンプル中のB-TG量は、以下のようにFMA活性と関連していた：

変数： B-TG対FMA

サンプル数： 41

スベアマン R： 0.7674

T-値： 6.1927

2-テイル P： <0.0001

図6は、データの代表的プロットを示す。

実施例11

ECCA活性は以下の手順で決定される。

細胞調製

1、3-4個のPrimaria（Farcon #3824）75cm²フラスコで、ウサギ創傷毛管内皮（Rabbit Wound Capillary Endothelial：RWCE）を60-85%“集密的”に成長させる。

2、走化性の約20-24時間前に、培地を除去してHBSS（Ca/Mgを含まない、6ml/フラスコ）でフラスコを2回（2x）洗う。

3、最後のHBSS洗液を除去して、各フラスコに12-15ml（一貫して）の培地199中の0.2%ラクトアルブミンを添加する（これは最少栄養を提供し、血清誘導化刺激を減少するので、細胞は誘因物質に反応する準備ができてい）。フラスコの培地交換の時間を記録する。

4、翌日、以下のものを準備する：

a) M199（LA-M199）中の50-100ml 0.2%ラクトアルブミン

b) 9ml HBSS中に1ml EC2（10X）を希釈することによる、20-30ml（5ml/75cm²フラスコ）のエンザイムカクテルNo. 2（EC2-1X）

5、0.2% LA-M199を除去してフラスコを6-10ml HBSSで洗う。直ちに5ml EC2（1X）を加えて、室温で正確に14分間インキュ

特表平5-500516 (9)

バージョンする。

6、酵素の不活性化を助長するために、少なくとも2ml/フラスコの0.2% LA-M199を含む50mlのポリプロピレンチューブにフラスコからのEC2をプールの。直ちに各フラスコに5mlの0.2% LA-M199を加える。

7、滅菌細胞スクレーパー (American Scientific Products Cat. #T4206-1) で底から細胞をそっとかき出す。

8、EC2プールに細胞/培地を加える。最終リンス用として、1個のフラスコに10mlの0.2% LA-M199を加える。リンス液をフラスコからフラスコへ移して、細胞と共にプールの。

9、もしも最終容量が40mlを越す場合には、遠心のために細胞を2つのチューブに分ける。細胞を室温、1400rpm (Mistral 13000遠心器で約450g) で10分間遠心する。

10、素早く注ぎ出すことにより上澄みを捨てる。ペレットを合計8mlの0.2% LA-M199に再懸濁 (もしも分けた場合にはプールの) し、15mlの遠心管に移す。更に2mlの培地で管を洗浄し、再懸濁した細胞に加える。室温、1400rpmで10分間遠心する。

11、細胞をカウントするために、2-5mlの0.2% LA-M199 (再遠心を避けるために、ペレットサイズ及び予測した細胞収率に容量を調整する) 中に再懸濁する。

12、細胞のカウント:

- 細胞懸濁液30ulをトリパンブルー30ulに加える。
 - 血球計数器の両側にのせる。
 - 10倍の倍率で、8個の1mm²中の細胞をカウントする。生存細胞 (ブルー) の数を記録する。異常なサイズや形の細胞をカウントしないこと。
 - 生存細胞数に2.5x10³をかけた数が1ml当たりの細胞数である。
- 13、細胞濃度を0.75x10⁶細胞/ml LA-M199 (即ち、33.750細胞/45ulのウェル) に調整する。約2.25ml/チャンバーが必要である。

要である。

a) 例: 1ml当たり1.5x10⁶細胞が3mlあるとする。この場合、最終的には以下の容量に調整すべきである:

$$\frac{(3\text{ml}) (1.5 \times 10^6 \text{細胞/ml})}{(0.75 \times 10^6 \text{細胞/ml})} = 5.95\text{ml}$$

従って、最終濃度0.75x10⁶を得るためには、0.2% LA-M199を2.95ml加える。簡単に言うと、33.750細胞/45ul 0.2% LA-M199/ウェルの濃度での細胞/チャンパー値で45ウェルを準備する。

*提案される容量

フラスコサイズ	0.2% LA-M199	HBSS	EC2 (1X)
(cm ²)	栄養培地(ml)	洗浄(ml)	
(ml)			
25	5	5	3
75	15	6-10	5
150	30	10-15	10

フィルターの準備

- 凍結ストックから20mlの1ugフィブロネクチン (Sigma #F4759) /1ml HBSS (FN/HBSS) を調製する。この調製のためにのみポリプロピレン製チップとチューブを用いる。(例: 凍結ストック=1ng/ml dH₂O-HBSS。従って、HBSS 19.8mlにストック200ulを希釈する。) 使用時まで氷上に保存。
- 1チャンパー当たり1個のNucleporeポリプロピレンフィルター (8.0um pores, PVDF, Neuro Probe Inc., 301-229-8598) を使用。
- フィルター*の方向性を与えるために、フィルターの光っている側の上左隅

を切り取る。フィルターの取り扱い、決して手ではなく、ピンセットで行い、かつ端のみを持つこと。

4、滅菌ベトリ皿の中央にFN/HBSS 3-4mlを入れる。光っている側を下にして、FN/HBSSの上にフィルターを置き、FN/HBSSをフィルターの下に広げさせるようにし: フィルター上にFN/HBSSを全くのせないようにする。

5、ベトリ皿の蓋をして室温で30分間置く。

6、FN/HBSSを注意深く注ぎ出し (フィルターをくっ付かせたまま、中身を片側に傾け、完全に注ぎ出す)、フィルターを持ち上げて、新しいFN/HBSS 3-4mlを中央に入れて、フィルターの他の側について (曇っている側を下にする) 同様に繰り返す。

7、これでコーティングは完了し、フィルターは使用可能になる。

- *注: a) 一貫性を得るために、底部チャンパーの充填時が、フィルターの第2の側のコーティング完了と一致するように、フィルターを直ちに使用する。
- b) 2枚のフィルターを準備するときは、同時に両方を充填するために急がなくてもよいように、第2のチャンパーを充填する前に第1のチャンパーを充填できるよう、コーティング時間を15分間ずらすことを勧める。

チャンパーの準備

- 蒸留水 (dH₂O) 保存浴からNeuro Probeの48ウェル走化性チャンパーを取り出す。きれいなdH₂Oでよく洗浄する。頂部部品とガスケット (gasket) をティッシュで乾燥して、底部部品をきれいな窒素ガスで吹き付け乾燥する。
- チャンパー底部にのせる試験サンプルを準備する。各ウェルは約溶液26.0-26.5ulを有している。
- 下のチャンパーにあるウェルにサンプル (約26.1-26.5ul) を加える。

*注: a) 所望の“ポジティブな液体面の凹凸 (meniscus)”を得るために、液体でやや“上部を除去”することが必要である。これは、残りのチャンパーを充填する間に起きる乾燥を中和する働きをする。泡の生成を避けること。

b) 最良の一貫性を得るためには、ポジティブな置換ピペットを使用する。両チャンパー端における4個のウェルの最初と最後のカラム (A, L) は走化性には用いないので、これらをHBSSで充填する。従って、上のチャンパーの同じ列もHBSSで充填し、細胞を充填しない。

4、フィルターの準備ができたら、上記した方法でFN/HBSSを注ぎ出す。ベトリ皿から注意深くフィルターを持ち上げる; いずれの側も皿の端に触れてはならない。フィルターをゆっくりと持ち上げることで、フィルター上の残りのFN/HBSSは少なくなる。この時点でフィルターを不注意に落としたり、これに触れてはならない。

5、ピンセットでフィルターの両端を持ち上げて、フィルターの中央をチャンパー中央におろし、次いで底部ウェルを覆う。フィルターは光っている側を上にするように!

*注: 常にチャンパー/フィルターの一貫性を保持すること; 即ち、常にチャンパーの商標を保持して、フィルターの左上隅の部分切り取る。

- 必要な場合にのみ、フィルターを正しい位置に置くために少し調節する。
- フィルターのすぐ上にガスケットを置くが、触れないようにする。
- チャンパーの上半分をガスケットの頂部に置き、両者を一緒に下に押す。スクリューに気を付けながら、きっちりと下に押す。
- チャンパーをチェックし、ウェルを見渡してフィルターの下に泡ができていないかを再度確認する: 泡は走化性を妨害するので、あればこれを記録する。
- 10、両端 (A, L) の4個のウェルにHBSS 45ulを加える。
- 11、次いで細胞懸濁液45ul (即ち、1ml当たり0.75x10⁶個の細胞) を、残りのウェルに加える。

*注：底部の空気を捕捉しないようにピペットの先端を一定の角度にして細胞を加える。もしも泡ができたなら、注意深く液体を出して、再度充填する。充填後は、すべてのウェルが均一に見えるようにする。そうでない場合には、捕捉空気を疑い、やり直すこと。

12、チャンバーをガラス又はポリプロピレンのトレイにのせて、水に浸したガーゼ片を置いて（これは湿度を増し、蒸発を防ぐ）、アルミニウムホイルでゆるやかにカバーする。

13、37℃、5% CO₂で4時間インキュベーションする。

フィルターの除去及びふき取り

- 1、スライドガラスの一方の端に目付とチャンバー番号を刻む。アルコールでよく清潔にし、乾燥する。
- 2、頂部プレートを下に持って残りのゴミを除く。
- 3、商標が上左隅になるように、ペーパータオル上にチャンバーを置く。
- 4、水平軸に沿って全チャンバーをペーパータオル上に逆さにする。
- 5、頂部プレートの四隅を押して、これが下へ落ちて底部プレートと平行になるようにする。フィルターはガスケットに付いていなければならない。
- 6、底部プレートを除去して直ちにテルガジム (Ter g a z y m e) 溶液 (テルガジム 1/4 ティースプーン / d H₂O 1000 ml) 中に浸す。
- 7、“移動した細胞”がここで現れてくる。ここからはフィルターの面を乱してはならない。
- 8、ピンセットでフィルターの一疊右端をつまみ、左端はそのままの状態、フィルターを少し右に引っ張り、端だけが縁にかかるようにする。
- 9、プラスチッククリップでこの端をつかみ、フィルターをガスケットから持ち上げる。他の端に素早くもう1個のクリップをつける。チャンバーの頂部部品を直ちにテルガジム中に入れる。
- 10、細胞側を上にして（常に）非移動側をPBS中で湿らせる。“移動細胞”をPBSで湿らせてはならない。
- 11、フィルターをびんと張り、ワイパーブレードに対して非移動側を引く（一

方向のみに、一方の端から他方へ）。

12、この工程を4-5回繰り返す。湿潤とふき取りの間の時間を最小にして、非移動細胞が乾燥/固着して不完全な除去になることを防ぐ。各ふき取りの前にワイパーブレードを常に乾燥する。

13、適当な刻んだスライド上に、刻んだ方と同じ端に切り取った隅がくるが、ただし反対側になるように、フィルターを置く。一夜乾燥させる。

14、テルガジムに入れて置いたチャンバー部品をd H₂Oで洗浄し、チャンバーをきれいにするまで新しいd H₂O中に保存する。

フィルターの染色

染色後、直ちにフィルターを洗めるようにデンシトメーター (LKB) の用意をしておく。

- 1、切り取った隅を持つ乾燥フィルター/スライドの端に、小さい黒のクリップを置く。
- 2、3つの溶液の各々に、順次5回、各回に5秒ずつ浸すことにより、Leuk o S t a t 染色 (F i s h e r ブランド) する。溶液ごとに過剰の染料をペーパータオル又はガーゼでふき取る。
- 3、5回目の後、第3の染料に更に30秒間フィルターを浸ける。
- 4、d H₂O中でフィルターを洗浄する (d H₂Oを2回取り替える)。過剰のd H₂Oをふき取る。
- 5、他のきれいなガラススライド (マークなし) をフィルター上に直接のせて、注意深く、しかししっかりと一緒に押し付けて空気の泡を追い出す。
- 6、デンシトメーターを洗む。

染色フィルターのデンシトメーター読み取り

- 1、10-20分間デンシトメーター (LKB) を暖めておく。
- 2、染色した、湿ったスライドを読み取りテーブルに置き、以下の正しいセッティングにする：

チャンバーの掃除

以下の手順は、走化性チャンバー及びガスケットから残液タンパク質などを除去するのに用いる (出典：Terri Superdock, 118:61, 2/21/89)。

- 1、汚れたガスケット及びチャンバーを脱イオン水でよく洗浄する。対応するガスケットとチャンバーを1リットルのプラスチックビーカー中に入れる (2セット/ビーカー)。
- 2、0.75%テルガジム溶液 (7.5 gmテルガジム/1リットルd H₂O : 500-750 ml / 2チャンバー) を50℃に加熱する。50℃を越えてはならない。
- 3、チャンバーとガスケットを50℃テルガジムで置く。
- 4、ビーカーを50℃水浴中に入れる。水浴をカバーして2時間インキュベーションする。

*ガスケットの掃除については工程10及び11を参照されたい。

- 5、チャンバーのみを取り出し、d H₂Oでよく洗浄する。チャンバーを1リットルのプラスチックビーカー (1000 ml) 中に入れる：2-3チャンバー/ビーカー)。
- 6、チャンバーを室温、1M NaOH (600-700 ml / ビーカー) で置く。ビーカーをフォイルでカバーする。
- 7、ビーカーを50℃のカバーした水浴中で30分間インキュベーションする。
- 8、チャンバーをd H₂Oで非常によく洗浄する。チャンバー及び大きな攪拌棒を深いプラスチックタブに入れる。攪拌棒の回転を妨げないようにチャンバー (頂部及び底部) の向きを整える。タブを流しのそばのマグネティックスターラーに乗せる。
- 9、タブにd H₂Oを満たし、2時間流しっぱなしにする。水が正しく循環しているかを確認し、オーバーフローしないようにタブ中に入れたサイフォンを流しに導く。
- 10、ガスケットを0.75%テルガジムを入れたビーカー中に入れて、30分間超音波処理する。

カラム	Xポジション	“トラック”
B	113.6	1
C	119.6	2
D	127.0	3
E	132.6	4
F	138.6	5
G	146.6	6
H	152.6	7
I	158.0	8
J	166.0	9
K	171.6	10

その他のデンシトメーターセッティング

- a) スムージング： 3
- b) x-幅： 4
- c) y-スタート： 19
- d) y-ストップ： 43

- 3、スライドを並べる。カラムポジションを確認する。
- 4、スライドを動かさずに下にスライドを留める。
- 5、各列での“Y”セッティングを確認する。
- 6、ルーラーを“home”に送る。“Ecs”
- 7、蓋を閉じる。
- 8、デンシトメーターを“Enter” (コンピューター上で) にし、次いで“6” (又は“Run”) にする。
- 9、LKBの“GSXL”プログラムを用いて、デンシトメーターからのピーク面積を計算する。

- 11、 dH_2O でよく洗浄し、ガスケットを1リットルの dH_2O に入れる。30分毎に水を変えて、2時間超音波処理する。
- 12、チャンパーとガスケットを組み立てて（スクリューで軽く留める）、新しい dH_2O を満たした平らなポリプロピレンのパンに入れる。アルミニウムホイールでカバーし、1週間に1回水を取り替える。
- 13、使用前にチャンパー及びガスケットを新しい dH_2O でよく洗浄する。

実施例12

KCCA活性は以下の手順によって定義される。

細胞の調製

- 1、正常ヒト表面上皮角化細胞（Normal Human Epidermal Keratinocyte: NHEK）のT-25フラスコ中の増殖細胞、KGM（Keratinocyte Growth Medium Supplemental and Serum Free）の500mlビン、KBM（Keratinocyte Basal Medium）の500mlビン、及び、HEPES Buffered Saline Solution Trypsin [(0.0025% W/V) / EDTA (0.01% W/V)] 溶液、トリプシン中和溶液からなる細胞培養試薬を含むEpi PackをClonetics Corporation, San Diego, Californiaから得る。
- 2、到着後、これを開き、37℃、5% CO_2 で、封をしたT-25フラスコを平衡化温度にインキュベーションする。
- 3、滅菌容器にKGM 5mlを暖める。
- 4、滅菌フィールド（バイオフィード）下でT-25フラスコを70%イソプロピルアルコールで徹底的に拭う。
- 5、培地を除去する：少量の漂白剤を含む容器に捨てて、暖めたKGM 5mlで置換する。キャップをねじって蓋をするが、あまり固くしない。
- 6、37℃のインキュベーションに戻し、細胞培養用に5% CO_2 で24-48時間湿潤化する。細胞培養物を集密的にはならない。

- 2、25℃、220 x gで10分間遠心する。上澄みを捨てる。
- 3、細胞ペレットをKBM 5mlに再懸濁して、遠心管中に入れる。
- 4、遠心し、上澄みを捨てて、KBM 2mlに再懸濁して血球計数器でカウントする。
- 5、走化性アッセイを実施し、新しい密度をセットする。

注：1、走化性の目的のためには、ペレットをKBMに再懸濁する。

- 2、新しい細胞密度をセットするための細胞継代培養にのみKGMを使用する。

- 3、新しいKGM M, W, Fを細胞に与える。

T-75フラスコ用=15ml KGM

T-25フラスコ用=5ml KGM

走化性のための細胞調製

- 1、T-75フラスコからの細胞継代培養のところで記載した手順に従って細胞をトリプシン化し、遠心する。
- 2、細胞をKBMに再懸濁して、血球計数器でカウントする。合計細胞数 = (平均カウント) x (ml KBM) x (トリプシン希釈) x (1×10^4)
- 3、最終的細胞希釈度を 5.56×10^3 細胞/ml (又は25,000細胞/45ul)にする。

必要時まで細胞を氷上に保存する。

フィルターの調製

- 1、5ug/mlフィブロネクチン 20ml (Sigma #F4759)を凍結ストックから調製する。調製にはポリプロピレン滅菌チップ及びチューブを用いる。(例：凍結ストック=0.1mg/ml dH_2O -HBSS。従ってストック1,000ulをHBSS 19.0mlに希釈する) 使用時まで氷上に保存する。
- 2、1チャンパー当たり1個のNucleoporeポリプロピレンフィルター (8.0um pores, PVDF, Neuro Probe Inc., 303-229-8598)を使用する。

T-25フラスコからの細胞継代培養

- 1、バイオフィード下に、培地を除去（少量の漂白剤を含む容器に捨てる）して、HEPES緩衝液2mlで細胞を洗浄する。
- 2、HEPESを捨てて、トリプシン/EDTA溶液2mlを加え、2分間おく。
- 3、トリプシン/EDTAを除去し、トリプシン中和溶液2mlを含む滅菌遠心管中に入れる。フラスコのキャップをして顕微鏡下で観察する。
- 4、細胞が分離して丸くなるのを観察する。更に3分後、フラスコを一方の手のひらで1回と、他方の手のひらで1回たたく。顕微鏡下で細胞が浮遊するのを観察する。トリプシン化のため、4分以上にはならないこと。
- 5、バイオフィード下で、直ちにトリプシン中和溶液2mlを加えて洗浄する。細胞を滅菌遠心管（#3参照）に移して、新たにトリプシン中和溶液2mlでフラスコを洗浄して、遠心管に入れる。
- 6、顕微鏡下でフラスコをチェックする：キャップを閉じて細胞が残っていないか観察する。
- 7、もし大量の細胞が残っていたら、工程1から全工程を繰り返して、遠心管に加える。もし全く残っていないか、或いは少量だけなら、遠心工程に進む。
- 8、25℃、220 x gで10分間細胞を遠心して、上澄みを捨てる。
- 9、細胞ペレットを暖めたKGM 5mlに再懸濁して、血球計数器でカウントする。
- 10、所望の密度で新しいフラスコに接種する。

T-75フラスコからの細胞継代培養（70-80%集密的）

- 1、以下の量を用いる以外はT-25フラスコと同様の手順に従う：
 - a、HEPES緩衝液5ml
 - b、トリプシン/EDTA溶液7ml
 - c、トリプシン中和溶液7mlで細胞をフラスコから洗いだし、ブルーマックスチューブに移す。
 - d、フラスコをトリプシン中和溶液3mlで再び洗浄し、ブルーマックスチューブに入れる。

- 3、フィルター*の方向性を与えるために、フィルターの光っている側の上左隅を切り取る。フィルターの取り扱いは、決して手ではなく、ピンセットで行い、かつ端のみを持つこと。

- 4、滅菌ベトリ皿の中央にFN/HBSS 3-4mlを入れる。光っている側を下にして、FN/HBSSの上にフィルターを置き、FN/HBSSをフィルターの下に広がらせるようにし、フィルター上にFN/HBSSを全くのせないようにする。

- 5、ベトリ皿の蓋をして室温で30分間置く。

- 6、FN/HBSSを注意深く注ぎ出し（フィルターをくっかせたまま、中身を片側に傾け、完全に注ぎ出す）、フィルターを持ち上げて、新しいFN/HBSS 3-4mlを中央に入れて、フィルターの他の側について（覆っている側を下にする）同様に繰り返す。

- 7、これでコーティングは完了し、フィルターは使用可能になる。

*注：a）一貫性を得るために、底部チャンパーの充填時が、フィルターの第2側のコーティング完了と一致するように、フィルターを直ちに使用する。
b）2枚のフィルターを準備するときは、同時に両方を充填するために急がなくてもよいように、第2のチャンパーを充填する前に第1のチャンパーを充填できるよう、コーティング時間を15分間ずらすことを勧める。

チャンパーの準備

- 1、蒸留水 (dH_2O) 保存浴からNeuro Probeの48ウェル走化性チャンパーを取り出す。きれいな dH_2O でよく洗浄する。頂部品とガスケットをティッシュで乾燥して、底部部品をきれいな窒素ガスで吹き付け乾燥する。
- 2、チャンパー底部にのせる試験サンプルを準備する。各ウェルは約溶液26.0-26.5ulを有している。
- 3、下のチャンパーにあるウェルにサンプル (約26.1-26.5ul)を加える。

特表平5-500516 (12)

*注：a) 所望の“ポジティブな液体面の凹凸”を得るために、液体でやや上部を除去”することが必要である。これは、残りのチャンバーを充填する間に起きる乾燥を中和する働きをする。泡の生成を避けること。
b) 最良の一貫性を得るためには、ポジティブな置換ピペットを使用する。両チャンバー端における4個のウェルの最初と最後のカラム(A, L)は走化性には用いないので、これらをHBSSで充填する。従って、上のチャンバーの同じ列もHBSSで充填し、細胞を充填しない。

4、フィルターの準備ができたら、上記の方法でFN/HBSSを注ぎ出す。ベトリ皿から注意深くフィルターを持ち上げる；いずれの側も皿の端に触れてはならない。フィルターをゆっくりと持ち上げるにより、フィルター上の残りのFN/HBSSは少なくなる。この時点でフィルターを不注意に落としたり、これに触れてはならない。

5、ピンセットでフィルターの両端を持ち上げて、フィルターの中央をチャンバー中央におろし、次いで底部ウェルを覆う。フィルターは光っている側を上にするように！

*注：常にチャンバー／フィルターの一貫性を保持すること；即ち、常にチャンバーの商標を保持して、フィルターの左上隅の部分を取り除くこと。

- 6、必要な場合にのみ、フィルターを正しい位置に置くために少し調節する。
- 7、フィルターのすぐ上にガasketを置くが、触れないようにする。
- 8、チャンバーの上半分をガasketの頂部に置き、両者を一緒に下に押す。スクリュウに気を付けながら、きっちりと下に押す。
- 9、チャンバーをチェックし、ウェルを見渡してフィルターの下に泡ができていないかを再度確認する：泡は走化性を妨害するので、あればこれを記録する。
- 10、両端(A, L)の4個のウェルにHBSS 45 μ lを加える。
- 11、次いで細胞懸濁液 45 μ l (即ち、1ml当たり0.75 $\times 10^6$ 個の細胞)を、残りのウェルに加える。

*注：底部の空気を捕捉しないようにピペットの先端を一定の角度にして細胞を加える。もしも泡ができたなら、注意深く液体を出して、再度充填する。充填後は、すべてのウェルが均一に見えるようにする。そうでない場合には、捕捉空気を疑い、やり直すこと。

12、チャンバーをガラス又はポリプロピレンのトレイにのせて、水に浸したガーゼ片を置いて（これは湿度を増し、蒸発を防ぐ）、アルミニウムホイルでゆるやかにカバーする。

13、37℃、5% CO₂で4時間インキュベーションする。

フィルターの除去及びふき取り

- 1、スライドガラスの一方の端に目付とチャンバー番号を刻む。アルコールでよく清潔にし、乾燥する。
- 2、頂部プレートを下に持って残りのゴミを除く。
- 3、商標が左上隅になるように、ペーパータオル上にチャンバーを置く。
- 4、水平軸に沿って全チャンバーをペーパータオル上に逆さにする。
- 5、頂部プレートの四隅を押して、これが下へ落ちて底部プレートと平行になるようにする。フィルターはガasketに付いていなければならない。
- 6、底部プレートを除去して直ちにテルガジム溶液（テルガジム1/4ティースブーン/dH₂O 1000ml）中に浸す。
- 7、“移動した細胞”がここで現れてくる。ここからはフィルターの面を乱してはならない。
- 8、ピンセットでフィルターの一審右端をつまみ、左端はそのままの状態、フィルターを少し右に引っ張り、端だけが縁にかかるようにする。
- 9、プラスチッククリップでこの端をつかみ、フィルターをガasketから持ち上げる。他の端に素早くもう1個のクリップをつける。チャンバーの頂部部品を直ちにテルガジム中に入れる。
- 10、細胞側を上にして（常に）非移動側をPBS中で湿らせる。“移動細胞”をPBSで湿らせてはならない。
- 11、フィルターをびんと張り、ワイパーブレードに対して非移動側を引く（一

方向のみに、一方の端から他方へ）。

- 12、この工程を4-5回繰り返す。湿潤とふき取りの間の時間を最小にして、非移動細胞が乾燥／固着して不完全な除去になることを防ぐ。各ふき取りの前にワイパーブレードを常に乾燥する。
- 13、適当な刻んだスライド上に、刻んだ方と同じ端に切り取った隅がくるが、ただし反対側になるように、フィルターを置く。一夜乾燥させる。
- 14、テルガジムに入れて置いたチャンバー部品をdH₂Oで洗浄し、チャンバーをきれいにするまで新しいdH₂O中に保存する。

フィルターの染色

染色後、直ちにフィルターを読めるようにデントミーター（LKB）の用意をしておく。

- 1、切り取った隅を持つ乾燥フィルター／スライドの端に、小さい黒のクリップを置く。
- 2、3つの溶液の各々に、順次5回、各回に5秒ずつ浸すことにより、LeukoStat染色（Fisherブランド）する。溶液ごとに過剰の染料をペーパータオル又はガーゼでふき取る。
- 3、5回目の後、第3の染料に更に30秒間フィルターを浸ける。
- 4、dH₂O中でフィルターを洗浄する（dH₂Oを2回取り替える）。過剰のdH₂Oをふき取る。
- 5、他のきれいなガラススライド（マークなし）をフィルター上に直接のせて、注意深く、しかししっかりと一緒に押し付けて空気の泡を追い出す。
- 6、デントミーターを読む。

染色フィルターのデントミーター読み取り

- 1、10-20分間デントミーター（LKB）を暖めておく。
- 2、染色した、湿ったスライドを読み取りテーブルに置き、以下の正しいセッティングにする：

カラム	Xポジション	“トラック”
B	113.6	1
C	119.6	2
D	127.0	3
E	132.6	4
F	138.6	5
G	146.6	6
H	152.6	7
I	158.0	8
J	166.0	9
K	171.6	10

その他のデントミーターセッティング

- a) スムージング： 3
- b) x-幅： 4
- c) y-スタート： 19
- d) y-ストップ： 43

- 3、スライドを並べる。カラムポジションを確認する。
- 4、スライドを動かさずに下にスライドを留める。
- 5、各列での“Y”セッティングを確認する。
- 6、ルーラーを“home”に送る。“Ecs”
- 7、蓋を閉じる。
- 8、デントミーターを“Enter”（コンピューター上で）にし、次いで“6”（又は“Run”）にする。
- 9、LKBの“GSXL”プログラムを用いて、デントミーターからのピーク面積を計算する。

チャンバーの掃除

以下の手順は、走化性チャンバー及びガスケットから残渣タンパク質などを除去するのに用いる（出典：Terri Superdock, 118:61, 2/21/89）。

1. 汚れたガスケット及びチャンバーを脱イオン水でよく洗浄する。対応するガスケットとチャンバーを1リットルのプラスチックビーカー中に入れる（2セット／ビーカー）。
 2. 0.75%テルガジム溶液（7.5gテルガジム／1リットルdH₂O；500-750ml／2チャンバー）を50℃に加熱する。50℃を越えてはならない。
 3. チャンバーとガスケットを50℃テルガジムで覆う。
 4. ビーカーを50℃水浴中に入れる。水浴をカバーして2時間インキュベーションする。
- *ガスケットの掃除については工程10及び11を参照されたい。
5. チャンバーのみを取り出し、dH₂Oでよく洗浄する。チャンバーを1リットルのプラスチックビーカー（1000ml）中に入れる：2-3チャンバー／ビーカー）。
 6. チャンバーを室温、1M NaOH（600-700ml／ビーカー）で覆う。ビーカーをフィルムでカバーする。
 7. ビーカーを50℃のカバーした水浴中で30分間インキュベーションする。
 8. チャンバーをdH₂Oで非常によく洗浄する。チャンバー及び大きな攪拌棒を深いプラスチックタブに入れる。攪拌棒の回転を妨げないようにチャンバー（頂部及び底部）の向きを整える。タブを流しのそばのマグネティックスターラーに乗せる。
 9. タブにdH₂Oを満たし、2時間流しっぱなしにする。水が正しく循環しているかを確認し、オーバーフローしないようにタブ中に入れたサイフォンを通して流す。
 10. ガスケットを0.75%テルガジムを入れたビーカーに入れて、30分間超音波処理する。

11. dH₂Oでよく洗浄し、ガスケットを1リットルのdH₂O中に入れる。30分毎に水を変えて、2時間超音波処理する。

12. チャンバーとガスケットを組み立てて（スクリューで軽く留める）、新しいdH₂Oを満たした平らなポリプロピレンのパンに入れる。アルミニウムホイールでカバーし、1週間に1回水を取り替える。

13. 使用前にチャンバー及びガスケットを新しいdH₂Oでよく洗浄する。

実施例13

RCA活性は以下の手順で定義される。

血管形成促進活性を試験するための各サンプル用として、2-4個のポリマーベレットを製作する。Hydron®ポリマーとして入手可能な、タイプNCC、細胞培養グレード（HydroMed Sciences, New Brunswick, NJ 08901から市販されている）の10% v/vポリマー溶液、70% v/vエタノール中の1% v/vポリエチレングリコールを準備する（これ以後ポリマー溶液と呼ぶ）。ポリマー溶液を試験サンプルと1:1 v/vで混合する。プラスチックのオートクレープバッグの一片を、ピンと張られていることを確認しながら、平らな表面にテープ付けする。次いでこの表面をアルコールでふき取り、乾燥させる。1:1混合物20ulをプラスチック上に滴下する。次いでポリマーベレットを減圧下で2時間、又は乾燥するまで、乾燥させる。

角膜移植アッセイを4-6ポンドのNew Zealandシロウサギ上で実施する。Veterinary Products, Bristol Laboratories, Syracuse, NY 13201からKetaset®として市販されている、塩酸ケタミン100mg/mlとAveco Co., Inc., Fort Dodge, IA 50501からPromace®として市販されているアセプロマジンマレエート10mg/mlとを同じシリンジ中で1:1 v/vで混合することによって、麻酔を調製する。各ウサギにつき4-5ccを用いる。23ゲージの針を用いて、麻酔剤を腎筋又は腓腹筋に注射して、注射後その部分をやさしくもむ。ウサギが我慢できずに上向きに横たわった

ら、正しく麻酔されたことになり、これには通常10-15分を要する。

ウサギを滅菌ドレープに置く。Allergan Pharmaceuticals, Inc., Irvine, CA 92713からOphthalmic®として市販されている0.5%塩酸プロパラス3-5滴を、部分麻酔として各目に適用する。試験中に目が乾燥したときにはいつでも、必要に応じて麻酔溶液を用いる。

小さい組織用ピンセットを用いて眼窩を引き出す。ピンセットをゆっくりと目の内隅に動かして、視神経を締め付けないように注意しながら、少量の組織をつまみ、作業中に目がこの位置に止まっていることを確認する。

Beaver Surgical Products, Waltham, MA 02154から市販されているBeaver eye blade No. 5210のスケーベル（scapel）を角尖に沿って静かに引き、約3.0mm長さの切片を切り取る。眼房水をしみ出させる角膜穿孔を引き起こすことがある。もしもこれが起きた場合には、動物を殺してしまわねばならない。

U. Mueller, Chicago, IL 60648から市販されている製品#OP-2040のElschnig毛様体剥離スパーテル（1mm幅、10mm長さ）を用いて、角膜を剥離させて毛細管床の方向にそって管を作り、毛細管床から約2mmのところまで止める。探針の先端を左右に動かしてポリマーベレットのための“ポケット”を作るが、ベレットが毛細管床から1mmよりも近くなならないように、探針を進め過ぎないように注意する。ピンセットでポリマーベレットをプラスチックから持ち上げて、眼の切片の場所に置く。スパーテルを用いて、ベレットを管に沿ってポケットまで押し込む。この領域を凝固化し、ベレット挿入を容易にするために麻酔溶液数滴を用いる。ベレットはポケット内に濃縮されねばならない。角膜の外側にある管に沿ってスパーテルを引くことにより、ポケットから捕捉空気を押し出す。

次いでピンセットを緩める。まぶたをそっと引き上げて手で開くと、目は正常の位置に戻る。感染の可能性を抑えるために、Burroughs Wellcome Co., Research Triangle Park, NC 27

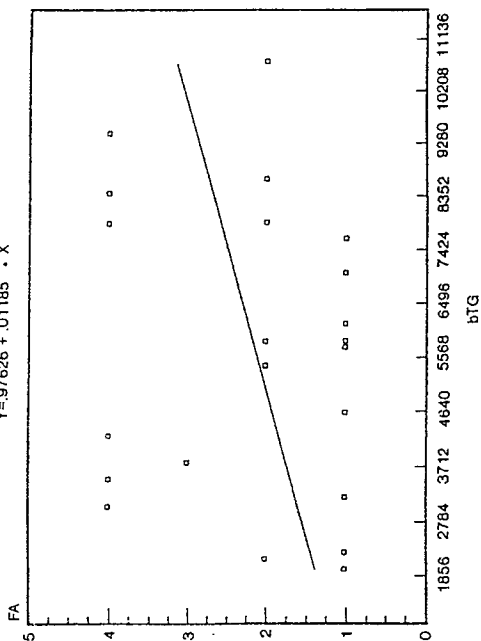
709からNeosporin®眼科溶液として市販されている抗菌溶液3滴を各目に投与する。

試験すべき各サンプルにつきウサギ1匹を用いる（即ち、ウサギ1匹につき同じサンプルを2ベレット、各目につき1個用いる）。

3、5及び7日目に、ベレット方向に毛細管が直接成長しているかについて、目を観察して、Gimbrone et al., J. Natl. Cancer Inst. 52:413-427(1974) 及びBanda et al., U.S. Patent No. 4,503,038（いずれもその内容全てを参照することにより、ここに包含される）の方法に従ってグレード分けする。毛細管の成長を記録するために7日目に目の写真を撮る。従って、本発明はその精神又は本質的特質を逸脱することなく、他の特殊な態様で実施することが可能である。これまでの記載から、本発明の精神又は範囲を逸脱することなく、上述した方法や手段の各種変更が可能であることが当業者には自明であろう。

図 3

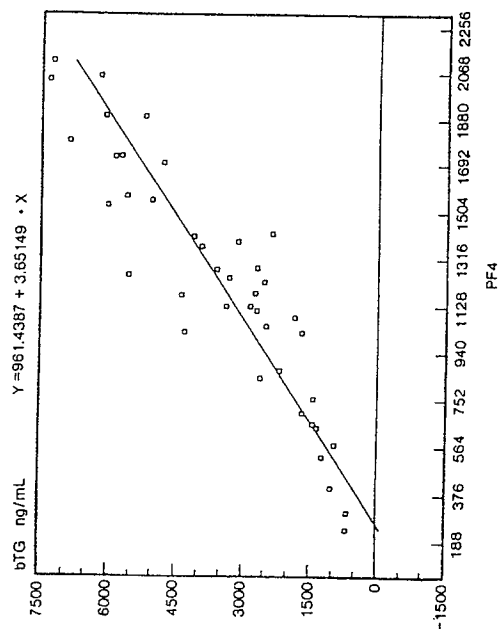
$$Y = 97626 + .01185 \cdot X$$



○ 700pt
— 回歸直線

図 4

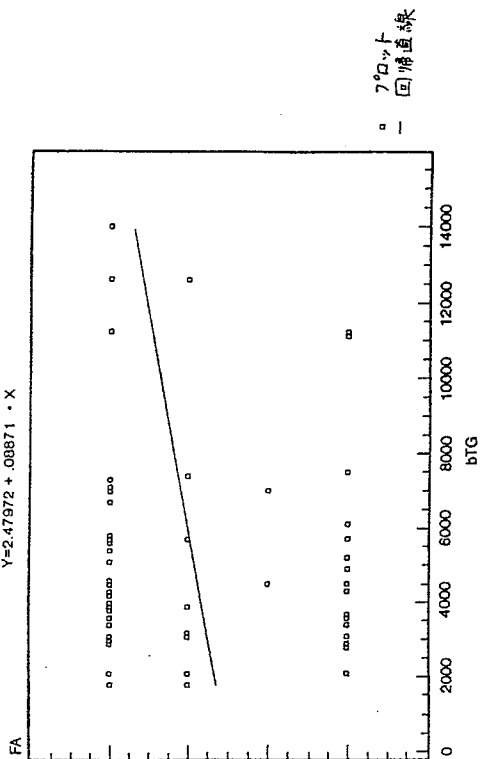
$$Y = 961.4387 + 3.65149 \cdot X$$



○ 700pt
— 回歸直線

図 1

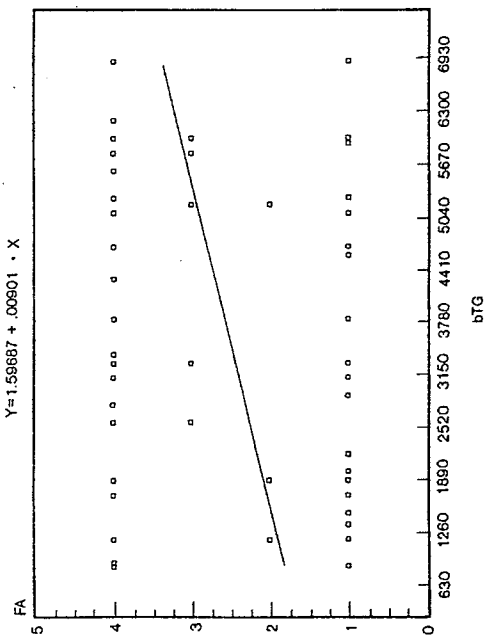
$$Y = 2.47972 + .00871 \cdot X$$



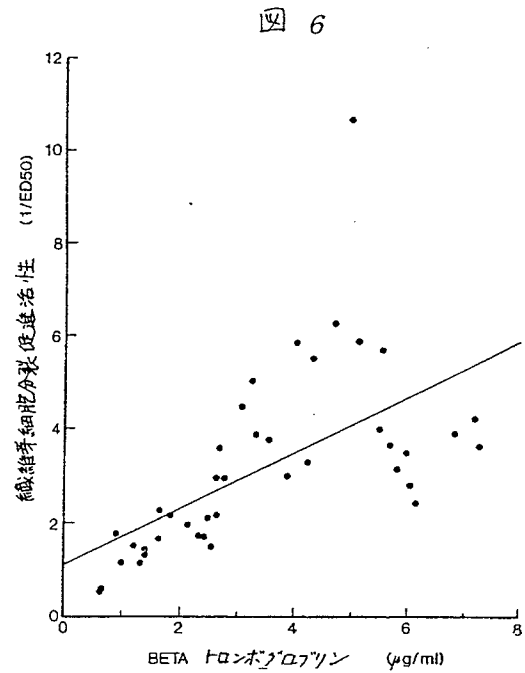
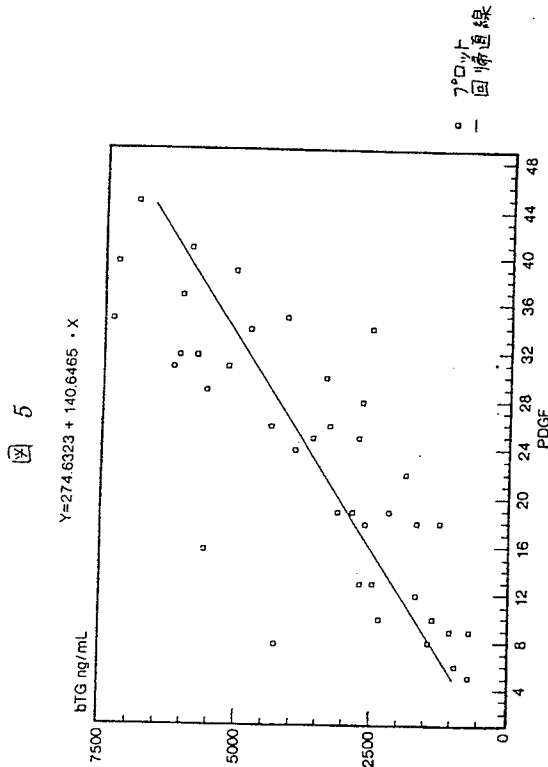
○ 700pt
— 回歸直線

図 2

$$Y = 1.59687 + .00901 \cdot X$$



○ 700pt
— 回歸直線



国際調査報告

International Application No. PCT/US90/05301

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER of several classification systems, indicate all:		
According to International Patent Classification (IPC) or to some National Classification and IPC		
IPC(s): A61K 35/14		
U.S. Cl.: 424/532		
2. FIELD SEARCHED		
Minimum Documentation Searched:		
Classification System: Classification Symbols		
U.S. Cl.: 424/532		
Documentation Searched after the Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched:		
Chemical Abstracts: "Platelet releasate"		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT:		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages **	Relevant to Claim No. **
X/Y	US, A, 4,760,131. (SUNDSHO et al.) 26 July 1988. see col. 3, line 65 to col. 4, line 5.	4,5/1-41
Y	US, A, 4,195,072 (WORKMAN, Jr.) 25 March 1980. see col. 1, line 63 to col. 2, line 50.	1-41
Y	Intl. Journal of Tissue Repl., Volume X(6) issued 1988, G. R. Grotendorst, "Growth Factors as Regulators of Wound Repair", pages 337-344. see entire document.	1-41
<p>* Special categories of cited documents: "</p> <p>"A" document defining the general state of the art in which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" document which may have been submitted as prior art but which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"C" document which may have been submitted as prior art but which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"D" document which may have been submitted as prior art but which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the applicant's claim to understand the procedure or thereby substantiating the invention</p> <p>"G" document of particular relevance; the claimed invention is defined by reference thereto or should be considered to involve an inventive step</p> <p>"H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is compared with one or more other such prior art documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"I" document number of the issuing patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search:	Date of Mailing of this International Search Report:	
26 October 1990	28 DEC 1990	
International Searching Authority:	Signature of Authorizing Officer:	
ISA/US	Jane Williams	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (May 1988)